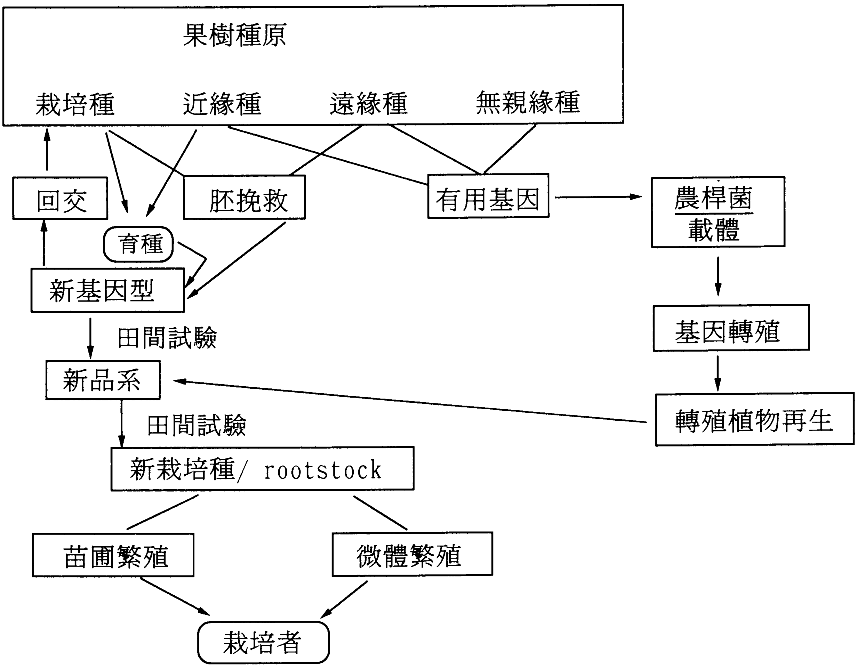
生物技術在果樹組織培養及種原保存上之應用

陳 福 旗
國立屏東技術學院農園生產技術系

前 言

果樹生物技術廣泛地說，爲在試管內增殖或操作果樹的細胞、組織、器官、植株、果樹之分子生物學，果樹之基因轉殖等。由於多數果樹是多年生作物，其繁殖方式爲營養系繁殖，少數可用種子繁殖，因此其遺傳組成較複雜，多爲異質性(heterogeneous) 與異型結合性(heterozygous)，在雜交育種上較不容易，因此要改良果樹，除了傳統育種方法外，由於近年在植物分子生物學及基因操作技術的進步，使得利用非傳統的生物技術能夠應用於果樹之改良。而有許多有用的園藝性狀，必須從所收集保存的種原中去分離鑑定，基本上我們可以從栽培種、近緣種、遠緣種、甚或沒有親緣關係的物種去搜尋(圖一)，亦能自動物或微生物中，將有用基因分離出來，加以改造，使其能以適當方法被導入果樹細胞，而產生我們所需要的特性。



圖一 生物技術在果樹種原之利用及基因轉殖

在這一章中，我們將討論果樹組織培養的進展，其在基因轉移上的用途，及果樹種原變異的鑑定，包括以傳統的生化標誌如同功異構酵素(isozymes)以及新近發展的分子標誌如RFLP、RAPD或DNA指紋圖譜等，這些新技術在分析果樹特定性狀間之連鎖關係上，有極大用處，因為如果應用於雜交世代的早期，例如苗期，我們將有很大的機會把所要的單株在早期選拔出來；我們也有機會直接在保存的種原中，利用生物技術方法將有用品種品系〝釣出來〞，以便可以直接利用於生產。但是要學習這些新技術，需要一些時間及耐心，並且須要以團隊合作的方式才容易達成，因此同一研究單位中，有的專精於種原的栽培管理，有的專門組織培養、分子生物學、基因轉殖、育種及遺傳等，就能夠把一種耗時經年的作物在短時間將擬解決的問題迅速解決。而且，不管怎麼操作，最後你的植物還是要種到果園，這是我們學習新技術所必須體認的一點。

果樹之組織培養與轉殖

一、組織培養、體細胞變異與品種改良的進展

有關各種果樹組織培養誘導器官或體胚發生之培養基及培植體，已有一篇記錄詳細的報告(Litz & Gray, 1992)，因此本文僅略為討論最近的發展。二倍體柑橘品種(2n=18)與三倍體品種(3n=27)雜交後代可選出單倍體，其機率(1/58 及 1/54)雖然不高，為產生單倍體的一種新方法(Oiyama & Kobayashi, 1993)。Thidiazuron(TDZ) 及 N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea(forchlorfenuron, CPPU)為兩種化學合成之尿素衍生物，具有很強的 cytokinin 活性，因此近年來漸被使用於木本植物的組織培養誘導不定芽或體胚。富士蘋果的子葉培養於含 BA 及 NAA 之 1/3MS 培養基，誘導之癒合組織可在含 4 mg/l CPPU 之培養基長出不定芽(Liu et al., 1994)；這個結果或許能應用於蘋果之轉殖上。試管內生長之蘋果(*Malus prunifolia* Borkh. MO-84)根部培植體培養於含 2.19-3.29 mg/l TDZ之培養基，可再生許多不定芽(Masuda et al., 1994)，因此本屬之果樹似可仿效本方法，並能應用於基因轉殖。柑橘類之珠心胚胚性癒合組織在誘導後，以液體懸浮培養，可以獲得較均勻的細胞團或胚性癒合組織(Vu *et al.*, 1995)，在生物技術應用上可以研究其代謝、生理生化、以及基因操作。Hidaka(1995)提出一個新概念，稱為〝shuttle callus system〞，意即誘導體胚後，可再由體胚誘導產生胚性癒合組織，如此反覆操作，可將體胚再生成植株，或進行轉殖之研究。國內在香蕉胚性癒合組織及基因轉殖的研究上，也有不錯的成就(徐、廖、黃，1995)。

在體細胞培養產生之變異方面，近年的一些成果，與前面提過同一本專書中一章已有論述，因此本文只引用其部份結果(Hammerschlag, 1992)。桃經組織培養產生之變異，可以加以篩選而產生抗細菌性斑點病(由*Xanthomonas campestris* pv. pruni 引起)之品系(Ritchie *et al.*, 1993)。用類似方法，亦可篩選出較耐桃潰瘍病或根瘤線蟲之品系(Hammerschlag *et al.*, 1995)。檸檬(*Citrus limon* (L.) Burm. *f.*)原生質體培養於含0.5 μM 之真菌病原分泌之毒素(*Phoma tracheiphila* toxin)，由耐毒素之兩個細胞系中(protoclones)，再生之植株再檢定其抗病性，與耐病品種 'Monachello' 之耐病性相當，而比原親本 'Femminello' 之耐病性高(Deng *et al.*, 1995)。蘋果品種 'Redspur Delicious' 經過微體繁殖，在田間產生一些較易芽條變異的植株，且開花期較早、著果早、株形較小；取此種易變之枝條再進行組織培養，在田間之特性恢復原品種之整齊度，但其芽條變異仍多約 30% (Zimmerman, 1995)。由蘋果品種 'Greensleeves' 葉片再生的植株，選出較耐火燒病菌(*Erwinia amylovora*) 品系 (Donovan *et al.*, 1994)。

本省栽培之香蕉目前多以莖頂組織培養方式來大量繁殖，種植於田間後，可見一小部份發生型態上的一些變異(Hwang & Ko, 1987)，如花序、株高，或抗病性之改變，如香蕉研究所在田間篩選出抗黃葉病之品系 GCTCV-215-1 (Hwang *et al.,* 1993)。煮食蕉亦有體細胞營養變異體發生，在株形、果實成熟度、葉片大小、及產量等產生變異,大部份變異均無實用價值，因爲其園藝性狀比原來親本差。

木瓜爲本省重要熱帶果樹之一，其組織培養再生已有多篇報告，最近 Yang & Ye (1992) 報告以葉柄誘導癒合組織，並由癒合組織再生成體胚。蓮霧之莖頂在含 IBA, BA 及 2iP 之 MS 培養基培養，其增殖倍率約爲 8 倍(余、楊，1989)。利用此系統建立無菌苗，若要併入轉殖研究系統中，仍需探討以莖段、葉片、葉柄、甚至體胚再生的條件，目前仍沒有相關的報告，有待果樹組培工作群的努力。

二果樹之轉殖

要轉殖果樹，必須具備幾個條件，包括：1. 組織培養再生系統；2. 基因轉移之技術；3. 欲轉移之目標基因及載體。許多重要果樹的再生系統均已被報告，因此從文獻查詢可以找到所須資料，但是並非參照別人所發表的培養基或培養條件就可以成功，因爲可能我們要做的果樹品種不同，基因型不同，則可能其試管內之反應有所差異。我們可以參考已發表之配方，再經過試驗及修改，以適合於我們的需求。基因轉移的方法包括農桿菌法、粒子槍投射法(microprojectile bombardment, biolistic process, particle gun)、電穿孔法(electroporation)、電泳法(electrophoresis)及其它方法。以前二者被使用的最廣泛，且成果也最大，表一列出一些重要果樹轉殖的例子。

有關轉殖用之載體，依基因轉移技術之不同而可大至分爲兩類，一種爲間接轉殖用之載體，即農桿菌載體，通常含有一段 T-DNA，內含邊界序列(border sequences)、選拔基因(selectable markers)、目標基因(target genes)、及報導基因(reporter genes)。直接轉殖用之載體可以不含邊界序列，且其分子通常較小。詳細資料請參考下列文獻，Draper *et al.* (1988)；Garland & Davey (1995)；Gelvin & Schilperoort (1994)；Kung & Wu(1993)；Maliga *et al.* (1995)。

果樹轉殖的最大目的爲創造新品種，抗病毒病、抗蟲、抗眞菌、細菌品種、提高果實採後品質等，因此目標基因的選用視試驗的目的而有所不同。現在能夠取得到的目標基因有：病毒外鞘蛋白基因(coat protein gene)、病毒複製酵素基因(replicase gene)、番茄抗斑點病基因(Pto)、抗眞菌基因(如 chitinases, β-1,3-glucanases, 其它 anti-fungal proteins 基因)、抗蟲基因(如蘇力菌毒素蛋白 Bt 基因)、抗殺草劑基因、樹型矮化基因(如 rolC, 光敏素基因)、果實品質基因(如與細胞壁有關的 polygalacturonase，與乙烯合成有關的 ACC synthase、ACC oxidase 等之反義基因)。植物轉殖，以農桿菌爲例，通常要下列步驟：

1. 培養農桿菌，如 LBA4404，其中含有目標基因，例如含 pBI121 載體。

↓

2. 將試管苗之葉片莖段或其它適當組織，與農桿菌共培養 2-3 天。

↓

3. 在篩選培養基(再生培養基＋carbenicilllin＋kanamycin)中把農桿菌殺死，並使被轉殖之細胞再生。

4.再生之芽體使其發根，用染色法辨別轉殖植株。

↓

5.利用分子生物技術確認轉殖植物。

↓

6.溫室觀察轉殖果樹之特性是否發生變化。

↓

7.(獲得許可進行)田間試驗。

其它方法之步驟基本上也類似上面所述，目前已有多種果樹被轉殖(表一)，雖然證實利用還有一段時間，但總是有做就有希望。例如蘋果及草莓經過轉殖，產生抗蟲之植株(James *et al.,* 1993)。日本園藝學會 1995 年之年會中，有幾篇爲關於果樹之轉殖報告，其一爲柿之葉片與攜有蘇力菌抗蟲基因 *cryIA(c)*之農桿菌共培養，在篩選培養基可發生癒合組織，其後長出不定芽，轉殖植株正測試其抗蟲性。奇異果用類似方法，可將 *OSH1*基因轉移，該基因爲自水稻分離之一種同源異位基因(homeotic gene)，轉入煙草使其葉片會發生許多不定芽，並提早開花。椪柑的原生質體以電穿孔方法(electroporation)可將含報導基因之載體 pBI221 轉入細胞，轉殖癒合組織之 GUS 活性表現受到電場強度及鈣離子濃度之影響。

表一 果樹之轉殖方法及轉移之基因

作物	轉殖方法	轉移基因
桃(*Prunus persica*)	粒子槍	GUS, NPTII
李(*P. salicina*)	農桿菌	PRSV-CP
李(*P. domestica*)	農桿菌	Plum pox virus
杏(*P. armeniaca*)	農桿菌	Plum pox virus
蘋果(*Malus* x *domestica*)	農桿菌	GUS, NPTII
葡萄(*Vitis vinifera*)	農桿菌	GUS, NPTII
	粒子槍、農桿菌	番茄輪點病毒 CP
(V. rupestris)	農桿菌	GUS, NPTII
(V. 'Chancellor')	粒子槍	GUS, NPTII
柑橘(*Citrus* spp.)	農桿菌	NPTII，HPT
原生質體	電穿孔	GUS, NPTII
木瓜(*Carica papaya*)	粒子槍、農桿菌	PRSV-CP
	農桿菌	PRSV-CP
草莓(*Fragaria* x *ananassa*)	農桿菌	GUS, NPTII
胡桃(*Juglans regia*)	農桿菌	GUS, NPTII
柿(*Diospyros kaki*)	農桿菌	Bt(cryIA(c))
柿(*Diospyros kaki*)	農桿根菌(*A. rhiz.*)	
柿(*Diospyros kaki*)	野生型農桿菌	
奇異果(*Actinidia chinensis*)	?	OSH1
香蕉(*Musa acuminata*)	農桿菌	GUS, NPTII
煮食蕉(*Musa* 'Bluggoe')	粒子槍	GUS, HPH

利用野生型之農桿根群菌(*Agrobacterium rhizogennes*)，能夠轉殖柿子之莖部，被轉殖之品種包括 '富有'、'Jiro'、及 'Nishimurawase'，並且富有柿形成腫瘤之比率最高，平均有 50% 的培植體產生腫瘤。再生之轉殖柿子型態發生變化，如變矮化、發根能力降低。野生型農桿菌不同品系引起試管柿苗之莖部產生腫瘤，而且以 A281 及 C58 之致病力最强(Tao *et al.,* 1995)。木瓜在台灣的生產不會受到國際市場的影響，因此利用轉殖方法將抗輪點毒素病毒外鞘蛋白基因(PRSV-CP)轉入木瓜，可望產生抗病品種，目前夏威夷大學在木瓜轉殖技術上居於領先地位，已利用農桿菌或粒子槍技術把 PRSV-CP 基因導入，田間試驗結果顯示轉殖植株具有不同程度的抗病性(Fitch, 1991;Fitch *et al.,* 1990, 1992, 1993; Manshardt *et al.,* 1995)，抗病植株葉片可以偵測到外鞘蛋白的合成(Lius, 1994)。轉殖之蘇魯品種爲雌株，與野生型雜交之後代對夏威夷之三個致病力强之病毒分離系(isolates)顯示高度抗病性，但接種其他國家之分離系則顯示不同程度的罹病性(Tennant *et al.,* 1995)。轉殖病毒的複製酵素基因(replicase gene)使植物產生免疫或抗病毒能力增强，在很多植物已被證實,因此在木瓜之抗病轉殖上，目前也是研究的重點。

果樹種原之保存、鑑定及利用

果樹種原之保存在去年度之研習會中已有專著詳述(許，1995)，在此僅補充一些最近的資料，低溫下保存果樹種原可以維持約 1-2 年，視作物種類而定(表二)。Sakai(1984)已經詳細敘述果樹的莖頂冷凍保存，而果樹生物技術一書中亦對於低溫試管保存及凍結保存有豐富的資料。蘋果之保存主要以營養系種植在田間保存，但田間保存可能因不良氣候、病蟲害、管理不當等因素而損失，因此美國國家種子保存實驗室(National Seed Storage Laboratory, Fort Collins, Colorado)將收集的 500 個以上材料(accessions)以休眠芽方式來冷凍保存，並且推薦用於葡萄(*Vitis*)及 *Prunus* 屬果樹。臍橙之珠心細胞經電穿孔將 pBI221 轉殖後，轉殖細胞可在液態氮中冷凍保存，冷凍後之活力爲 90%，冷凍方法爲利用高濃度溶質(例如蔗糖)使細胞玻璃質化(vitrification method)後再放入液態氮中保存(Kobayashi *et al.,* 1994)。

當收集之種原數目很多時，或品種間要加以鑑定區別時，可以利用生化標誌(biochemical markers)，例如同功異構酵素(isozymes)，柑橘類雜交之後代若無適當型態特性可以辨別，必須等實生苗或珠心胚苗長大後再加以鑑定，可在苗期取子葉分析其同功異構酵素(吳、陳、劉，1989)，判別是否爲兩親本雜交之混合型而早期選出雜交苗。亦可利用最近發展出來的 RFLP、RAPD。在品種專利上可能有用的技術包括以簡單的重複序列(simple sequence repeats, SSRs)或所謂的迷你衛星序列(microsatellite, MS)做爲引子(primers)進行聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，而產生 DNA 指紋圖(fingerprints)。這些新技術在育種家或種苗公司育成新品種時，對於品種之權利有極大幫助。在小麥，利用 MS 可以偵測出血源很接近的品種及品系。日本梨17個品種以人類之 MS 核酸探針可以辨別其親本子代關係(Teramoto *et al.,* 1994)。其他果樹如蘋果(Nybom & Scheel, 1990)、柑橘(Matsuyama *et al.,* 1992)均已能利用分子標誌來鑑定品種品系。梅之品種可以用同功異構酵素來分類(Aoki *et al.,* 1972; Ujiie *et al.,* 1991)，最近以 RAPD 分析，可將多種品種分爲七群，台灣梅爲其中一群(Shimada *et al.,* 1994)。柑橘染色體含有一種高度變異性之中等重複序列(hypervariable middle repetitive sequence)，這一種序列和微衛星序列不同，因此亦可做爲品種鑑定的依據，並能用以分辨有性胚與珠心胚植株(Orford *et al.,* 1995)。由蘋果分離出與自

交不親和蛋白質類似之S-RNase或S-like RNase基因，用來當探針，兩個序列可以區別自交親和及自交不親和之材料，而且可以分辨栽培種 *M. domestica* 之不同品種(Matsumoto *et al.*, 1995)。

葡萄之品種變異性，如用同功異構酵素，有五種(LAP; menadione reductase, MNR；PGI；PGM及PRX)可做爲鑑定品種之依據。GOT 酵素系統能用來探討柑橘屬間之親緣關係(Rahman & Nito, 1994a,b)，因此在育種上，屬間或種間之雜交後代可以用此酵素配合RAPD或核酸指紋圖來加以鑑定。Xiao 等人(1995)研究柑橘種間雜交分離代之同功異構酵素，找到五對爲具有連鎖關係。二倍體越桔(*Vaccinium darrowi*)與四倍體之 *V. corymbosum* 雜交產生之後代具異型結合性(heterozygosity)，傳統上其遺傳方式較難評估，因此以RAPD技術可以探討多倍體之異型結合性(Qu & Hancock, 1995)。

分子標誌可以用來研究與抗病基因之連鎖關係，如枳殼抗黃龍病毒(citrus tristiza virus, CTV)之單株以RAPD產生之標誌，找到一個共顯性及數個顯性的SCARs(sequence characterized amplified region)有連鎖關係，因此在選拔雜交後代時即可用這些標誌來判別幼苗是否有抗病能力。

表二 低溫或慢速生長保存果樹種原的例子

種類	保存條件	保存期間(月)	文獻
獼猴桃	培養基加活性碳	9	Wilkins *et al.* 1988
獼猴桃	低溫(8℃)、黑暗、低鹽濃度、改變賀爾蒙	12	Monette, 1986
咖啡	培養基不加蔗糖、半量鹽類	≧24	Kartha *et al.*, 1981
草莓	低溫(1℃/4℃)、黑暗、必要時補充液體培養基	27	Mullin & Schlegel, 1976
蘋果	低溫(1℃/4℃)	12	Lundergan & Janick, 1979
香蕉	低溫(15℃) 弱光(1000-2000 lux)	12-18	Banerjee & De Langhe, 1985; Schoofs, 1990
Prunus spp.	低溫(-3℃/4℃)、黑暗	≧10	Marino *et al.*, 1985
Prunus spp.	低溫(4℃)、黑暗、去除葉片	18	Druart, 1985
梨 (*Pyrus communis*)	低溫(4℃)	≧18	Wanas *et al.*, 1986
P. pashia	低溫(4℃/10℃)	12	Wilkins *et al.*, 1988
葡萄 (*Vitis rupestris*)	低溫(9℃)	10	Galzy, 1969
葡萄	低溫(9.5℃)	≧12	Barlass & Skene, 1983

表三 利用分子或生化標誌建立遺傳連鎖圖或義多型性之果樹

作物	Isozymes	RFLP	RAPD	MS
扁桃 (*Prunus amygdalus*)	+	+		mini satellite
桃 (*P. persica*)	+		+	
酸櫻桃 (*P. cerasus*)	+			
李 (*P. domestica*)			+	
梅 (*P. mume*)	+		+	
日本梨 (*Pyrus* spp.)		+		
蘋果 (*Malus domestica*)	+	+	+	
胡桃 (*Juglans regia*)	+	+		
可可 (*Theobroma cacao*)	+	+	+	
柑橘 (*Citrus* spp.)	+	+	+	
葡萄 (*Vitis* spp.)	+		+	+
香蕉 (*Musa* spp.)	+			+
草莓 (*Fragaria* x *ananassa*)	+		+	
藍莓 (*Vaccinium ashei*)		+	+	
芒果 (*Mangifera indica*)				+
荔枝 (*Lichi chinensis*)	+			+
釋迦 (*Annona* spp.)			+	
木瓜 (*Carica papaya*)	+			+
酪梨 (*Persea americana*)				+
柿 (*Diospyros kaki*)	+			
腰果 (*Anacardium occidentale*)			+	

參考文獻

陳福旗，李弘文。1987。簡易澱粉膠體電泳裝置及其在同功異構酶上的應用。中華農業研究 37: 24-31。

陳福旗，溫英杰，黃碧娥，李弘文。1989。桃品種間同功異構酶變異性之研究。中國園藝 35: 183-192。

許圳塗。1995。作物種質體外保存系統。刊於：台灣省農業試驗所編印。作物種原保育技術研習會專刊，第69-80頁。

徐善德、廖玉琬、黃鵬林。1995。應用農桿菌媒介法進行香蕉之轉殖。中國園藝學會八十四年度年會摘要，p.13。

臺灣省農業試驗所。1995。作物種原保育技術研習會專刊。臺灣省農業試驗所，霧峰。

吳明哲，卓俊銘。1986。柑橘葉片同功異構酶之研究。I、本省重要柑橘葉片之電泳分析與葉齡對分析結果之影響。中華農業研究 35:484-494。

吳明哲，陳福旗，劉邦基。1989。電泳技術在柑橘育種上之應用。刊於：柑橘試驗研究成果專題討論會專集，PP.44-49，臺灣省農業試驗所，霧峰，台中。

余浩然、楊耀祥。1989。蓮霧莖頂組織培養之研究。中興園藝14:31-43。

Adato, A., D. Sharon, U. Lavi, J. Hillel & S. Gazit. 1995. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analyses of mango (*Mangifera indica*) genotypes. J. Amer. Sco. Hort. Sci. 120: 259-264.

Arus, P., C. Olarte, M. Romero & F. Vargas. 1994. Linkage analysis of ten isozyme genes in F1 segregating almond progenies. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119:339-344.

Arulsekar, S., R. S. Bringhurst & V. Voth. 1981. Inheritance of PGI phosphoglucoisomerase and LAP leucine aminopeptidase isozymes in octoploid cultivated strawberry. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106: 679-683.

Arulsekar, S., D. E. Parfitt & G. H. McGranahan. 1985. Isozyme gene markers in *Juglans* species. J. Hered. 76:61-63.

Arulsekar, S., G. H. McGranahan & D. E. Parfitt. 1986. Inheritance of phosphoglucomutase and esterase isozymes in Persian walnut. J. Hered. 77:220-221.

Baribault, T. J., K. G. M. Skene, P. A. Cain & N. S. Scott. 1990. Transgenic grapevines: Regeneration of shoots expressing β-glucuronidase. J. Exp. Bot. 41:1045-1049.

Beaver. J. A. & A. F. Iezzoni. 1993. Allozyme inheritance in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118:873-877.

Beltoff, L. E., R. Ballard, A. Abbott, W. V. Baird, P. Morgens, A. Callahan, R. Scorza & R. Monet. 1993. Development of a saturated linkkage map of Prunus persica using molecular based marker systems. Acta Hort. 336:51-56.

Bhat, K. V., S. R. Bhat, K. P. S. Chandel, S. Lakhanpaul & S. Ali. 1995. DNA fingerprinting of *Musa* cultivars with oligodeoxyribonucleotide probes specific for simple repeat motifs. Genet. Anal. Biomol. Eng. 12:45-51.

Bretting, P. K. & M. P. Widrlechner. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. HortScience 30(7):1349-1356.

Callahan, A. M., R. A. Cohen, L. J. Dunn & P. H. Morgens. 1993. Isolation of genes affecting peach ripening. Acta Hort. 336:47-50.

da Camara Machado, A., E. Knapp, H. Puhringer, G. Seifert, V. Hanzer, H. Weiss, Q. Wang, H. Katinger & M. L. da Camara Machado. 1995. Gene transfer methods for the pathogen-mediated resistance breeding in fruit trees. Acta Hort. 392:193-202.

Dale, P. J. 1995. R & D regulation and field trialling of transgenic crops. TIBTECH 13:398-403.

Dandekar, A. M., G. H. McGranahan & D. J. James. 1993. Transgenic woody plants. In: Kung, S. -d. & R. Wu(eds), Transgenic Plants, Vol. 2, pp. 129-151, Academic Press, San Diego.

Degani, C., A. Beiles, R. El-Bastsri, M. Goren & S. Gazit. 1995. Identifying lychee cultivars by isozyme analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:307-312.

Deng, R., D. J. Donnelly & D. J. Buszard. 1993. Field performance of micropropagated and

conventionally propagated red raspberry. Acta Hort. 336:185-192.

Deng, Z., F. G. Gmitter, Jr., S. Xiao & S. Huang. 1995. Development of Scar markers tightly linked to the CTV resistance gene in *Poncirus trifoliata.* HortScience 30:783.

Deng, Z. N., A. Gentile, F. Domina, E. Nocolosi & E, Tribulato. 1995. Selecting lemon protoplasts for insensitivity to *Phoma tracheiphila* toxin and regenerating tolerant plants. J. Amer. soc. Hort. Sci. 120:902-905.

Donovan, A. M., R. Morgan, C. Valobra-piagnani, M. S. Ridout, D. J. James & c. M. E. Garett. 1994. Assessment of somaclonal variation in apple. I. Resistance to the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora.* J. Hort. Sci. 69:105-113.

Draper, J., R. Scott, P. Armitage & R. Walden (dse). 1988. Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual. Blackwell Sci. Pub., Oxford.

Figueira, A., J. Janick & P. Goldsbrough. 1992. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao.* J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117:673-677.

Fitch, M. M. M. 1991. Development of genetic transformation systems for papaya. PhD Dissertation, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.

Fitch, M. M., R. M. Manshardt, D. Gonsalves & J. L. Slightom. 1993. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Rep. 12:245-249.

Fitch, M. M., R. Manshardt, D. Gonsalves, J. Slightom & J. Sanford. 1990. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 9:189-194.

Fitch, M. M., R. Manshardt, D. Gonsalves, J. Slightom & J. Sanford. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissue bombard with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio/Technology 10:1466-1472.

Fjellstrom, R. G., D. E. Parfitt & G. H. McGranahan. 1994. Genetic relationships and characterization of Persian walnut (Juglans regia L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119:833-839.

Forsline, P. L., L. E. Towill, J. Waddell & L. Wiesner. 1995. Development of a base collection of Malus germplasm with cryopreserved dormant buds. HortScience 30:872.

Gardner, R. C. 1993. Gene transfer into tropical and subtropical crops. Sci. Hort. 55:65-82.

Gartland, K. M. A. & M. R. Davey (eds). 1995. *Agrobacterium* Protocols. Humana Press, New Jersey.

Gelvin, S. B. & R. A. Schilperoort (eds). 1994. Plant Molecular Biology Manual, 2nd ed., Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.

Gregor, D., W. Hartmann & R. Stosser. 1995. Cultivar identification in *Prunus domestica* using random amplified polymorphic DNA markers. 1995. Acta Hort. 359:33-40.

Haghighi, K & J. F. Hancock. 1992. DNA restriction fragment length variability in the genomes of highbush blueberry. HortScience 27:44-47.

Hammerschlag, F. A. 1992. Somaclonal variation. In: Hammerschlag, F. A. & R. E. Litz (eds). 1992. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. pp. 35-55. C.A.B. International, Wallingford, Oxford.

Hammerschlag, F. A. & R. E. Litz (eds). 1992. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. C.A.B.

International, Wallingford, Oxford.

Hammerschlag, F. A., D. Ritchie, D. Werner, G. Hashmil, L. Krusberg, R. Meyer & R. Huettel. 1995. In vitro selection of disease resistance in fruit trees. Acta Hort. 392:19-26.

Hancock, J. F. & P. A. Callow. 1994. Randomly amplified polumorphic DNAs in the cultivated strawberry, *Fragaria Xananassa.* J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119:862-864.

Hashmi, G. P., F. A. Hammerschlag, R. N. Hiettel & L. R. Krusberg. 1995. Growth, development, and response of peach somaclones to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita.* J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120(6):932-937.

He'bert, D., J. R. Kikkert, F. D. Smith & B. I. Reisch. 1993. Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions. Plant Cell Rep. 12:585-589.

Hemmat, M., N. F. Weeden, A. G. Nanganaris & D. M. Lawson. 1994. Molecular marker linkage map in *Malus.* J. Hered. 85:4-11.

Hidaka, T. 1995. A 'shuttle callus system'-Application of tissue culture in citrus. Acta Hort. 392:39-48.

Hidaka, T. & M. Omura. 1993. Transformation of *Citrus* protoplasts by electroporation. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62:371-376.

Hidaka, T., M. Omura, M. Ugaki, M. Tomiyama, A. Kato, M. Ohshima & F. Motoyoshi. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. Japan. J. Breed. 40:199-207.

Hwang, S. C. & W. H. Ko. 1987. Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to Fusarium wilt. In: Persley, G. J. & E. A. De Langhe (eds). Banana and Plantain Breeding Strategies, pp. 151-156. Proc. Intl. Wkshp., Cairns, Australia.

Hwang, S. C., W. H. Ko & C. P. Chao. 1993. GCTCV-215-1: A promising Cavendish clone resistant to race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense.* In: Valmayor, R. V., S. C. Hwang, R. Ploetz, s. W. Lee & N. V. Roa(eds). Recent Developments in Banana Cultivation Technology. Proc. Intl. Symp., Chiuju, Pingtung, Taiwan.

James, D. J., A. J. Passey, A. M. Dandekar, S. L. Uratsu, A. D. Webster, D. J. Barbara & P. Viss. 1993. Transgenic apples and strawberries:advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. Acta Hort. 336:179-184.

Kobayashi, S., A. Sakai, T. Ohgawara & Y. Nakamura. 1994. Stable maintenance of an integrated gene in nucellar cells of Navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) under storage in LN2. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:553-558.

Korte, A.-M., E. Mai β & R. Casper. 1995. *Agrobacterium* -mediated gene transfer as a tool for the induction of resistance against plum pox virus (PPV) in plum (*Prunus domestica* L.). Acta Hort. 359:164-168.

Kung, S.-D. & R. Wu (eds). 1993. Transgenic Plants, Vol. 1. Academic Press, San Diego.

Lamboy, W., C. Alpha, A. Szewc-McFadden & S. Bleik. 1995. Progress in the characterization of cold -hardy grapes using simple sequence repeat DNAs (SSRs). HortScience 30:783.

Lanaud, C., A. M. Risterucci, A. K. J. N'Goran, D. Clement, M. H. Flament, V. Laurent & M. Falque.

1995. A genetic linkage map of *Theobroma cacao.* Theor. Appl. Genet. 91:987-993.

Lavi, U., J. Hillel, A. Vainstein, E. Lahav & D. Sharon. 1991. Application of DNA fingerprints for identification and analysis of avocado. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:1078-1081.

Lawson, D. M., M. Hemmat & N. F. Weeden. 1995. The use of molecular markers to analyze the inheritance of morphological and developmental traits in apple. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:532-537.

Lius, S. 1994. Characterization and evaluation of papayas genetically transformed with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Master Thesis, 115pp. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.

Litz, R. E. & D. J. Gray. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag, F. A. & R. E. Litz (eds). 1992. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. pp. 3-34. C.A.B. International, Wallingford, Oxford.

Liu, M.-g., I. Ogiwara, N. Hakoda & I. shimura. 1994. Effects of BA, TDZ, and CPPU on formation of adventitious shoots from callus derived from apple cotyledons. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:505-514.

Lu, J., S. Langaigne & O. Lamikanra. 1994. Isozyme variation in grape cultivars grown in Florida and the Southeastern United States. Proc. Fla. State Hort. Soc. 107:306-308.

Lu, J., X. Qu &O. Lamikanra. 1995. Genetic diversity in muscadine and bunch grapes based on RAPD analysis. HortScience 30:877.

Lu, Z.-X., G. L. Reighard, W. V. Baird & A. G. Abbott. 1995. Study on genetic relationship of peach rootstockks by RAPD markers. HortScience 30:875.

Maimunah, M., R. M. Manshardt & F. Zee. 1995. Isozyme variability in wild and cultivated *Carica papaya.* HortScience 30:809.

Maliga, P., D. F. Klessing, A. R. Cashmore, W. Gruissem & J. E. Varner. 1995.Methods in Plant Molecular Biology, A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York.

Manshardt, R., S. Lius, S. Sondur, T. Wenslaff, M. Fitch, J. Sanford, F. Zee, D. Gonsalves, J. Stiles, S. Ferreira & J. L. Slightom. 1995. Papaya breeding for PRV resistance. Acta Hort. 370:27-31.

Martinelli, L. & G. Mandolino. 1994. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.) Theor. Appl. Genet. 88:621-628.

Masuda, T., H. Bessho, S. Komori & S. Tsuchiya. 1994. Effect of thidiazuron and casamino acid on adventitious shoot formation from roots of apple (Malus prunifolia Borkh. MO-84) plantlets cultured *in vitro.* J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:39-43.

Matsuda, S., N. Hoshi, T. Tsuchiya, J. Soejima, S. Komori & S. Ejiri. 1995. S-RNase like genomic sequences in apple for DNA fingerprinting. Acta Hort. 392:265-274.

Matsuoka, M., H. Ichikawa, A. Saito, Y. Tada, T. Fuimura & Y. Kano-Murakami. 1993. Expression of a rice homeotic gene causes altered morphology of transgenic plants. Plant Cell 5:1039-1048.

Matsuyama, T., R. Motohashi, T. Akihama & M. Omura. 1992. DNA fingerprinting in Citrus cultivars. Japan. J. Breed. 42:155-159.

May, G. D., R. Afza, H. S. Mason, A. Wiecko, F. J. Novak & C. J. Arntzen. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) Plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. Bio/Technology 13:486-492.

McGranahan, G. H., C. A. Leslie, S. L. Uratsu & A. M. Dandekar. 1990. Improved efficiency of the walnut somatic embryo gene transfer system. Plant Cell Rep. 8:512-516.

Mullins, M. G., F. C. A. Tang & D. Facciotti. 1990. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: Transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. Biotechnology 8:1041-1045.

Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. KK. Kartha, R. S. S. Dalta, W. L. Crosby & C. Stushnoff. 1990. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. Plant Cell Rep. 9:293-298.

Norelli, J. L. & H. S. Aldwinckle. 1993. The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase-transgenic apple tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118:31 1-316.

Nybom, H. & B. A. Scheel. 1990. DNA 'fingerprints' applied to paternity analysis in apples (*Malus x domestica*). Theor. Appl. Genet. 79:763-768.

Oiyama, I. & s. Kobayashi. 1993. Haploids obtained from diploid x triploid crosses of citrus. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62:89-93.

Orford, S. J., N. Scott & J. N. Timmis. 1995. A hypervariable middle repetitive DNA sequence from *Citrus*. Theor. Appl. Genet. 91:1248-1252.

Pan, S. Z. & J. C. Sanford. 1988. *Agrobacterium*-mediated gene transfer in papaya. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113:287-291.

Plaschke, J., M. W. Ganal & M. S. Roder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 91:1001-1007.

Qu, L. & J. F. Hancock. 1995. Nature of 2n gamete formation and mode of inheritance in interspecific hybrids of diploid *Vaccinium darrowi* and tetraploid *V. corymbosum*. Theor. Appl. genet. 91: 1309-1315.

Rahman, M. M. & N. Nito. 1994a. Inheritance and linkage relationships of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in *Microcitrus*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62:749-754.

Rahman, M. M. & N. Nito. 1994b. Phylogenetic relationships among the "True citrus fruit trees" by glutamate oxaloacetate transaminase isozymes analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62:755-760.

Ritchie, D. F., D. J. Werner & F. A. Hammerschlag. 1993. Field evaluation of tissue culture-derived peach trees for susceptibility to bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*). Acta Hort. 336:155-164.

Ronning, C. M. & R. J. Schnell. 1995. Using randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) Markers to identify *Annona* cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:726-729.

Ronning, C. M., R. J. Schnell & D. N. Kuhn. 1995. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:681-686.

Rowland, L. J. & E. L. Ogden. 1993. Efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry suitable for use in *Agrobacterium*-mediated transformations. Acta Hort. 336:193-198.

Sagi, L., S. Remy, B. Verelst, B. Panis, B. P. A. Cammue, G. Volckaert & R. Swennen. 1995. Transient gene expression in transformed banana (*Musa* cv. Bluggoe) protoplasts and embryogenic cell suspensions. Euphytica 85:89-95.

Sagi, L., B. Panis, S. Remy, H. Schoofs, K. De Smet, R. Swennen & B. P. A. Cammue. 1995. Genetic transformation of bananna and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. Bio/Technology 13:481-485.

Sakai, A. 1984, Cryopreservation of apical meristems. Hort. Rev. 6:357-372.

Schuerman, P. L. & A. M. Dandekar. 1993. Transformation of temperate woody crops: Progress and potentials. Sci. Hort. 55:101-124.

Scorza, R., J. M. Cordts, D. J. Gray, D. W. Ramming & R. L. Emershad. 1995. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). HortScience 30:876.

Scorza, R., L. Levy, V. Damsteegt, L. M. Yepes, J. Cordts, A. Haditi, J. Slightom & D. Gonsalves. 1995. Transformation of plum with the papaya ringspot virus coat protein gene and reaction of transgenic plants to plum pox virus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:943-952.

Sharon, D., J. Hillel, A. Vainstein & U. Lavi. 1992. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of *Carica papaya* and other *Carica* species. Euphytica 62:119-126.

Sharon, D., A. Adato, S. Mhameed, U. Lavi, J. Hillel, M. Gomolka, C. Epplen & J. T. Epplen. 1995. DNA fingerprints in plants using simple-sequence repeat and minisatellite probes. HortScience 30:109-112.

Shimada, T., T. Haji, M. Yamaguchi, T. Takeda, K. Nomura & M. Yoshida. 1994. Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by RAPD assay. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:543-551.

Silva Neto, S. P., I. Maruta, F. Takaiwa, K. Oono & K. Matsumoto. 1995. Identification of cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings with RAPD markers. Acta Hort. 370:21-26.

Tao, R. & A. Sugiura. 1987. Cultivar identification of Japanese persimmon by leaf isozymes. HortScience 22:932-935.

Tao, R., S. L. Uratsu & A. M. Dandekar. 1995. Relavtive virulence of *Agrobacterium* strains on persimmon (*Diospyrus kaki* L.). Acta Hort. 392:171-178.

Tao, R., T. Handa, M. Tamura & A. Sugiura. 1994. Genetic transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* wild type strain A4. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:283-289.

Tennant, P., M. Fitch, S. Lius, C. Gonsalves, R. Manshardt, J. Sanford, J, L. Slightom & D. Gonsalves. 1995. Coat protein-mediated protection and classical cross protection to control papaya ringspot virus in papaya. Acta Hort. 370:7-11.

Teramoto, S., Y. Kano-Murakami, M. Hori & K. Kamiyama. 1994. 'DNA fingerprinting' to distinguish cultivar and parental relation of Japanese pear. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:17-21.

Ujiie, T., K. Shimura & H. Kyotani. 1991. Cultivar identification of *Prunus mume* by means of isozyme

banding patterns. J. Japan. Sco. Hort. Sci. 60:(Suppl. 2): 166-167.

Viruel, M. A., R. Messeguer, M. C. De Vicente, J. Garcia-Mas, P. Puigdomenech, F. Vargas & P. Arus. 1995. A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. Theor. Appl. Genet. 991: 964-971.

Vu, J. C. V., R. P. Niedz & G. Yelenosky. 1995. Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol -grown suspension cultures of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Environ. Exp. Bot. 35: 455-463.

Vuylsteke, D. R., R. L. Swennen & E. A. De Langhe. 1996. Field performance of somaclonal variants of plantain (*Musa* spp., AAB group). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:42-46.

Xiao, S. Y., W. C. Zhang, J. S. Cheng & S. Y. Wuan. 1995. Inheritance and linkage of isozymes in citrus. Acta Hort. 403:189-195.

Yang, J.-S. & C.-A. Ye. 1992. Plant regeneration from petioles of *in vitro* regenerated papaya (*Carica papaya* L.) shoots. Bot. Bull. Acad. Sin. 33:375-381.

Ye, X., S. K. Brown, R. Scorza & J. Cordts. 1994. Genetic transformation of peach tissues by particle bombardment. J. Amer. Sco. Hort. Sci. 119:367-373.

Yu, H. & T. M. Davis. 1995. Genetic linkage between runnering and phosphoglucoisomerase allozymes, and systematic distortion of monogenic segregation ratios in diploid strawberry. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:687-690.

Zee, F., K. M. Aradhya & R. M. Manshardt. 1995. Isozyme variation in lychee (*Lichi chinensis* Sonn.). HorScience 30:796.

Zimmerman, R. H. 1995. Variation in micropropagated trees of 'Redspur Delicious' apple. HortScience 30:871.